

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 4 月 3 日 (03.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/027672 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/50, 33/15, A61K
45/00, A61P 43/00, 25/28, 25/00, 25/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/09351

(22) 国際出願日: 2002 年 9 月 12 日 (12.09.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-287448 2001 年 9 月 20 日 (20.09.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目 3 番 1 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松本 俊一郎 (MATSUMOTO, Shunichiro) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 高崎 淳 (TAKASAKI, Jun) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 齋藤 哲 (SAITO, Tetsu) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 曾我 孝利 (SOGA, Takatoshi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 蒲原 正純 (KAMO-HARA, Masazumi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば

市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 比山 英樹 (HIYAMA, Hideki) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 長井 省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL SCREENING METHOD USING PROKINETICIN RECEPTOR

(54) 発明の名称: プロキネティシン受容体を用いた新規スクリーニング方法

(57) Abstract: An endogenous receptor to human prokineticins 1 and 2, which acts not on the digestive organ contraction or spermatogenesis functions but on the central functions, in particular, the nerve cell death-inhibitory function, is identified. A method of screening a substance capable of controlling the central functions, for example, a substance useful as a remedy for dementia, cerebral accident and/or hyperalgesia, which are known as being associated with nerve cell death, with the use of the above-described receptor and/or cells having been transformed by the receptor. To obtaining nerve cell death inhibitors and/or remedies for hyperalgesia, nerve cell death inhibitor screening tools comprising the prokineticin receptor GPRg2, a functionally equivalent variant thereof or a polypeptide homologous therewith, and nerve cell death inhibitor screening tools comprising transformant cells which have been transformed by an expression vector containing polynucleotide encoding one of the above-described polypeptides and express the polypeptide. A process for producing a medicinal composition for inhibiting the nerve cell death and/or treating hyperalgesia containing, as the active ingredient, a substance capable of modifying the activity of the above-described receptor which can be obtained by using any of the above-described screening tools or the screening method.

/続葉有/

WO 03/027672 A1



(57) 要約:

消化器収縮作用や精子形成作用には働かず、中枢作用、特に、神経細胞死抑制作用に働くヒトプロキネティシン1、2に対する内在性受容体を同定した。前記受容体および／又は前記受容体で形質転換した細胞を用いることによる中枢作用をコントロールできる有用な物質、例えば、神経細胞死を伴うことが知られている痴呆症、脳卒中、及び／又は痛覚過敏症の治療剤として有用な物質を簡便にスクリーニングする方法を開示する。

また、神経細胞死抑制剤、及び／又は痛覚過敏治療剤を得るためのプロキネティシン受容体GPRg2、機能的等価改変体、又は相同ポリペプチドである神経細胞死抑制剤スクリーニングツール、及び前記の各種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞である神経細胞死抑制剤スクリーニングツールを開示する。

さらに、前記スクリーニングツール又はスクリーニング方法により得ることができる、前記受容体の活性を修飾する物質を有効成分とする神経細胞死抑制剤、及び／又は痛覚過敏治療用医薬組成物の製造方法を開示する。

明 細 書

プロキネティシン受容体を用いた新規スクリーニング方法

技術分野

本発明は、プロキネティシン受容体を使用した神経細胞死及び／又は痛覚過敏を制御する物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

プロキネティシン (Prokineticin) は、ヒトでプロキネティシン 1 とプロキネティシン 2 の 2 種類のサブタイプが存在する生理活性ペプチドである (Mol Pharmacol. 2001 59:692-8)。もともとプロキネティシンは、1990 年にフランスのグループにより、マンバ (南アフリカ産のコブラ科の大型毒蛇) の蛇毒成分として同定され、「MIT1」と命名されたが (Toxicon. 1990 28:847-56)、後にオーストリアのグループにより、カエル皮膚より該当分子が精製され、「Bv8」と命名された (Eur J Pharmacol. 1999 374:189-96)。哺乳類のプロキネティシンは、1999 年にマウスプロキネティシン 2 遺伝子配列が報告され (FEBS Lett. 1999 26:177-81)、さらに同遺伝子がマウスでは第 6 染色体、ヒトでは第 3 染色体 p21 に存在している事が確認された (Gene. 2000 3:189-95)。2001 年には、ヒトゲノム配列データベース検索により、初めてヒトプロキネティシン 1 の存在が確認された (Mol Pharmacol. 2001 59:692-8)。

プロキネティシン 1、2 は、それぞれアミノ酸 105 個、108 個で構成される前駆体として細胞内で合成され、成熟分子ではシグナルペプチドの除去により、プロキネティシン 1 が 86 個、プロキネティシン 2 が 81 個になると考えられている。プロキネティシン 1、2 は、互いに約 55% の相同性を有しており、マンバ、カエルの該当分子に対しても 50% 以上の相同性がある。分子内には 5 本の S-S 結合が存在しており、これら Cys の位置は MIT1、Bv8 でも保存されている。プロキネティシンは立体構造が非常に安定でプロテアーゼ処理に対しても耐性を示す。

プロキネティシン 1 は、組織発現解析から脳、卵巣、腎臓、子宮、心臓、精巣

等、中枢および抹消組織で広範な発現パターンを示している。一方、プロキネティシン 2 も同様に広い組織発現が観察されるが、mRNA 転写量はプロキネティシン 1 に比べ低い(FEBS Lett. 1999 462:177-81、Mol Pharmacol. 2001 59:692-8)。

プロキネティシンの生理機能に関しては、①中枢作用として神経細胞死抑制活性(Eur J Neurosci. 2001 13:1694-702)や痛覚過敏惹起活性(Eur J Pharmacol. 1999 374:189-96)、②消化器収縮作用(Mol Pharmacol. 2001 59:692-8、FEBS Lett. 1999 461:183-8)そして③精子形成作用(FEBS Lett. 1999 462:177-81)が報告されている。プロキネティシンの神経細胞死抑制活性は、ラット小脳性顆粒初代培養細胞を用いて、増殖培地中のカリウム濃度を上昇させる事によるアポトーシス誘導実験系により、確認された。また同活性がマッピングキナーゼ(mitogen-activated kinase、MAPK)やホスファチジルイノシトール3キナーゼ(phosphatidylinositol-3-kinase、PI-3-K)阻害剤であるPD98059やLY294002により消失したことから、プロキネティシンはMAPK/PI-3-Kを介して細胞内情報伝達を行う、と考察されている。痛覚過敏惹起活性については、プロキネティシンがオピオイド系を介する痛覚過敏や、オピオイド・リガンドの脳内受容体結合には影響しないことから、オピオイド系とは、独立のシステムにより痛覚過敏が惹起されると考えられている。

しかしながら、上記のようにプロキネティシンの生理機能については報告があるものの、その受容体については最近になるまで同定されておらず、プロキネティシンの中枢作用を制御する化合物の簡便なスクリーニング系の構築はなされていなかった。W001/163609にプロキネティシン受容体の開示はあるが、該受容体は主に精巣に発現すると記載されている。従って、消化器収縮作用や精子形成作用には働かず、中枢作用、特に、神経細胞死抑制作用及び／又は痛覚過敏を制御する物質に働くヒトプロキネティシン1、2に対する内在性受容体分子を同定し、さらに該受容体を使用した神経細胞死抑制剤及び／又は痛覚過敏治療剤のスクリーニング方法が待望されている。

発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒトプロキネティシン1、2に対する内

在性受容体GPRg2をコードする遺伝子を同定することに成功した。GPRg2遺伝子はヒト扁桃核、海馬、脳梁、黒質、視床、前頭葉、及び胎児脳で発現しており、胃、小腸、精巣では発現していないこと、及びGPRg2遺伝子が一次知覚神経の投射を受けており侵害受容器により感受された痛みの刺激を脳に伝達する役割を担っている神経組織である脊髄後根神経節で発現していることより、GPRg2が消化器収縮作用や精子形成作用には働かず、中枢作用に働くヒトプロキネティシン1、2に対する内在性受容体分子であることを見出した。また、GPRg2の発現及び精製、並びにGPRg2を発現する形質転換細胞の生産を可能にした。加えて、GPRg2を発現させた細胞がプロキネティシンにより細胞内カルシウム濃度変化すること、プロキネティシンがGPRg2を安定発現するCHO細胞の膜面分に特異的に結合することを見出し、GPRg2及びGPRg2を発現する細胞が神経細胞死抑制を制御する物質、及び／又は痛覚過敏を制御する物質をスクリーニングするためのスクリーニングツールとなることを見出した。これらにより、プロキネティシン受容体の活性を修飾する物質を選択することによってプロキネティシンの神経細胞死抑制作用及び／又は痛覚過敏を制御することができる物質を同定することができ、引いては神経細胞死によって引き起こされる疾患治療薬、例えば、痴呆症治療剤、脳卒中治療剤、及び／又は痛覚過敏症治療剤として有用な物質を見出すことができる。本発明はこのような知見に基づくスクリーニングツール及びスクリーニング方法を提供するものである。

すなわち本発明は、

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドあるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列の1～10個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、

かつ、

プロキネティシン存在下で細胞内カルシウム濃度が上昇することにより活性が確認できるポリペプチドである、神経細胞死抑制剤スクリーニングツール、

(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、

かつ、

プロキネティシン存在下で細胞内カルシウム濃度が上昇することにより活性が確認できるポリペプチドである、神経細胞死抑制剤スクリーニングツール、

(3) (1) 又は (2) に記載のポリペプチドであり、神経細胞死抑制剤である痴呆症治療剤、脳卒中治療剤、及び／又は痛覚過敏症治療剤スクリーニングツール（以下、(1) ～ (3) 記載の神経細胞死抑制剤スクリーニングツール、痴呆症治療剤、脳卒中治療剤、及び痛覚過敏症治療剤スクリーニングツールを総称してポリペプチド型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールと称する）、

(4) (1) 又は (2) に記載のポリペプチドを発現している細胞である、神経細胞死抑制剤スクリーニングツール、

(5) (4) に記載の細胞であり、神経細胞死抑制剤である痴呆症治療剤、脳卒中治療剤、及び／又は痛覚過敏症治療剤スクリーニングツール（以下、(4) ～ (5) 記載の神経細胞死抑制剤スクリーニングツール、痴呆症治療剤、脳卒中治療剤、及び痛覚過敏症治療剤スクリーニングツールを総称して形質転換細胞型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールと称する）、

(6) (4) 又は (5) に記載の細胞、又は、その細胞膜と、試験化合物とをプロキネティシン存在下で接触させる工程、および前記ポリペプチドの活性変化を分析する工程を含むことを特徴とする、試験化合物がプロキネティシン受容体アンタゴニスト又はアンタゴニストであるか否かを検出する方法、

(7) (4) 又は (5) に記載の細胞、又は、その細胞膜と、試験化合物とをプロキネティシン存在下で接触させる工程、および前記ポリペプチドの活性変化を分析する工程を含むことを特徴とする、神経細胞死抑制剤をスクリーニングする方法、

(8) (4) 又は (5) に記載の細胞、又は、その細胞膜と、試験化合物とをプロキネティシン存在下で接触させる工程、および前記ポリペプチドの活性変化を分析する工程を含むことを特徴とする、神経細胞死抑制剤である痴呆症治療剤、脳卒中治療剤及び／又は痛覚過敏症治療剤をスクリーニングする方法、

(9) (7) 又は (8) に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び

前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程

を含むことを特徴とする、神経細胞死抑制用である痴呆症治療用、脳卒中治療用及び／又は痛覚過敏症治療用医薬組成物の製造方法に関する。

本明細書において、「スクリーニングツール」とは、スクリーニングの為に用いる物（具体的には、スクリーニングの為に用いるポリペプチド又はポリペプチドを発現している細胞）をいう。「神経細胞死抑制剤スクリーニングツール」とは、神経細胞死抑制剤、及び／又は痛覚過敏治療剤をスクリーニングするために、本発明の神経細胞死抑制剤、及び／又は痛覚過敏治療剤をスクリーニングする方法において、試験化合物を接触させる対象となる細胞又はポリペプチドである。

(1) ～ (5) に記載のポリペプチド又は細胞の、神経細胞死抑制剤、及び／又は痛覚過敏治療剤スクリーニングのための使用も本発明に含まれる。

前記W001/163609に主に精巢に発現するプロキネティシン受容体として開示された受容体は、本発明で用いることのできるプロキネティシン受容体GPRg2と87%のホモロジーを有している。一方、本発明で用いることのできるプロキネティシン受容体GPRg2と同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該ポリヌクレオチドがコードする推定アミノ酸配列については、種々の報告（W098/46620、W001/36471、W001/53308、W001/68699、W001/68700）があるが、いずれもリガンド及び用途が解明されていない。なお、本願優先日後に出版された論文（JBC 277, 22, pp19276-19280, 2002）において、本発明で用いることのできるプロキネティシン受容体と同一の配列の蛋白質がプロキネティシンの受容体であることが開示されているが、同論文の中では前記受容体は小腸の収縮や血管形成に関与すると記載されている。また本願優先日後に公開されたW002/6483において、15Eと称されるプロキネティシン受容体GPRg2と同一の受容体と、ヒトZARリガンドと称されるプロキネティシン1との結合が示されているが、これらの結合が中枢作用に関与するとの記載はなく、前記受容体とプロキネティシン2とが結合するとの記載もない。

前記のとおり、本願記載の神経細胞死抑制剤スクリーニングツール、神経細胞死抑制剤、及び／又は痛覚過敏治療剤スクリーニング方法、神経細胞死抑制用である痴呆症治療用、脳卒中治療用及び／又は痛覚過敏症治療用医薬組成物の製造

方法は本願発明者らが初めて行った発明である。

図面の簡単な説明

図1は、プロキネティシン受容体GPRg2を発現させたCHO細胞を用い、プロキネティシン1 (PK1) 又はプロキネティシン2 (PK2) を含むHEK293培養上清を添加したときのカルシウム濃度の経時変化を示すグラフである。

図2は、空ベクターを発現させたCHO細胞を用い、プロキネティシン1 (PK1) 又はプロキネティシン2 (PK2) を含むHEK293培養上清を添加したときのカルシウム濃度の経時変化を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書中で使用される「プロキネティシン受容体」は「プロキネティシン受容体蛋白質」を表す。「プロキネティシン」は「プロキネティシン1」、「プロキネティシン2」を含む。「アゴニスト」はプロキネティシン存在下、非存在下でプロキネティシン受容体の活性を促進する物質を表す。

[1] 神経細胞死抑制剤スクリーニングツール

本発明の神経細胞死抑制剤スクリーニングツールには、ポリペプチド型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールと形質転換細胞型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールとが含まれる。また、神経細胞死抑制剤スクリーニングツールとして、痴呆症治療剤、脳卒中治療剤又は痛覚過敏症治療剤スクリーニングツールが含まれる。

1) ポリペプチド型神経細胞死抑制剤スクリーニングツール

本発明のポリペプチド型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールとして用いることのできるポリペプチドとしては、例えば、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
- (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列の1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、プロキネティシン（好ましくはプロキネティシン2）存在下で細胞

内カルシウム濃度が変動することにより活性が確認できるポリペプチド(以下、機能的等価改変体と称する)；及び

(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロキネティシン(好ましくはプロキネティシン2)存在下で細胞内カルシウム濃度が変動することにより活性が確認できるポリペプチド(以下、相同ポリペプチドと称する)；

が含まれる。以下、本発明のポリペプチド型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールとして用いることができるこれらの各種ポリペプチドを総称して、スクリーニング用ポリペプチドと称する。

本発明の相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、プロキネティシン存在下で細胞内カルシウム濃度が変動することにより活性が確認できるポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなることができる。なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST(Basic local alignment search tool; Altschul, S.F.ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990)検索により得られた値を意味する。BLAST検索は、BLASTパッケージ [sgl32bit版, バージョン2. 0. 12; National Center for Biotechnology Information (NCBI) より入手] のbl2seqプログラム (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250, 1999) を用いて行うことができる。なお、パラメーターでは、ペアワイズアラインメントパラメーターとして、「プログラム名」として「blastp」を、「Gap挿入Cost値」を「0」で、「Gap伸長Cost値」を「0」で、「Matrix」として「BLOSUM62」をそれぞれ使用する。

以上、スクリーニング用ポリペプチドについて説明したが、該ポリペプチドとしては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」、あるいは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列の1~10個、好ましくは1~7個、より好ましくは1~5個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかも、プロキネティシン存在下で細胞内カルシウム濃度が変動するこ

とにより活性が確認できるポリペプチド」が好ましく、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」がより好ましい。スクリーニング用ポリペプチドは前記ポリペプチドである限り特に限定されるものではなく、その起源もヒトに限定されない。

例えば、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体が含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト由来の変異体、あるいは、ヒト以外の生物由来の機能的等価改変体）、あるいは、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのアミノ酸配列を、遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれる。なお、本明細書において「変異体」(variation)とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのヒトにおける変異体、あるいは、ヒト以外の生物由来の機能的等価改変体は、当業者であれば、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列（例えば、配列表の配列番号 1 で表される塩基配列）の情報を基にして取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法（例えば、Maniatis, T. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982）に従って実施することが可能である。

本発明のポリペプチド型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールとして用いることのできるスクリーニングツール用ポリペプチドは、種々の公知の方法によって得ることができ、例えば、目的蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。より具体的には、後述するスクリーニングツール用形質転換細胞（すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞）を、スクリーニングツール用ポリペプチドの発現が可能な条件下で培養し、受容体タンパク質の分離及び精製に

一般的に用いられる方法により、その培養物から目的タンパク質を分離及び精製することにより調製することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、機能的改変体をコードするポリヌクレオチド、及び相同ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挙げることができる。本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA 及び RNA の両方が含まれる。

スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(A) PCR を用いた方法、(B) 常法の遺伝子工学的手法（すなわち、cDNA ライブラリーで形質転換した形質転換株から、所望の cDNA を含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は (C) 化学合成法などを挙げることができる。以下、各製造方法について、順次、説明する。

(A) PCRを用いた方法

本発明のプロキネティシン受容体を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該受容体 mRNA 又は一部の mRNA 領域をはさんだ 2 種類のプライマーを作製する。逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（以下 RT-PCR という）を行うことにより、該プロキネティシン受容体 cDNA 又はその一部を得ることができる。さらに、得られたヒトのプロキネティシン受容体 cDNA 又はその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該受容体の蛋白質を製造することができる。

まず、本発明のプロキネティシン受容体の産生能力を有する細胞あるいは組織、例えばヒト脳から該蛋白質をコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織は、該蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロットティング法、該蛋白質に特異的な

抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

mRNAの精製は常法に従えばよく、例えばmRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAをさらに分画することもできる。また、mRNAを抽出せずとも、市販されている抽出済mRNAを用いても良い。

次に、精製されたmRNAをランダムプライマー又はオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第1鎖cDNAを合成する。この合成は常法によって行うことができる。また、cDNAは合成せずとも、実施例1、実施例2で用いているように、市販されているcDNAを用いても良い。得られた第1鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R. K. et al. (1988) Science 239, 487-491; 以下、PCRという)に供し、目的とするプロキネティシン受容体DNAを増幅する。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

(B) 常法の遺伝子工学的手法

まず、前記のPCRを用いた方法で調製したmRNAを鋳型として、逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としては、例えば、S1ヌクレアーゼ法(Efstratiadis, A. ら, Cell, 7, 279-288, 1976)、Land法(Land, H. ら, Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo法(Yoo, O. J. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、又はOkayama-Berg法(Okayama, H. 及びBerg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982)などを挙げることができる。

次に、前記2本鎖cDNAを含む組換えプラスミドを作製した後、大腸菌(例えば、DH5 α 株)に導入して形質転換させ、例えば、テトラサイクリン又はアンピシリンに対する薬剤耐性を指標として、組換え体を選択する。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には、Hanahanの方法(Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわち、CaCl₂、MgCl₂、又はRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に、前記組換えDNA体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしては、プラスミド以外にもラムダ系などのファージベ

クターを用いることもできる。

このようにして得られる形質転換株から、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する方法としては、例えば、以下に示す(1)合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング方法、(2)PCRにより作製したプローブを用いるスクリーニング方法、(3)他の動物細胞で目的ポリペプチドを産生させてスクリーニングする方法を採用することができる。

合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング方法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの全部又は一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブ(^{32}P 又は ^{33}P で標識する)として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。なお、プローブ用のオリゴヌクレオチドを合成する場合には、コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列とすることもできるし、あるいは、考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数のヌクレオチド配列とすることもできる。後者の場合には、イノシンを含ませてその種類を減らすことができる。

PCRにより作製したプローブを用いるスクリーニング方法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの一部に対応するセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの各オリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてPCRを行ない、目的ポリペプチドの全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、本発明のポリペプチドを産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、又はゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNA断片を、例えば、 ^{32}P 又は ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション又はプラークハイブリダイゼーションを行なうことにより、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

他の動物細胞で目的ポリペプチドを産生させてスクリーニングする方法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、形質転換株を培養し、ポリヌクレオチドを増幅させ、そのポリヌクレオチドを動物細胞にトランスフェクトし、ポリヌクレオチドにコードされたポリペプチドを細胞表面に産生させる。なお、この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミド、あるいは、動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれを用いることもできる。本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、本発明のポリペプチドを検出することにより、元の形質転換株の中から、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明のポリヌクレオチドを採取する方法は、公知の方法（例えば、Maniatis, T. ら, "Molecular Cloning—A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982）に従って実施することができる。例えば、細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、得られたプラスミドDNAからcDNA領域を切り出すことにより行なうことができる。

(C) 化学合成法

化学合成法を用いた方法では、例えば、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。各DNAは、DNA合成機〔例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、又は394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製) など〕を用いて合成することができる。

また、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの情報に基づいて、例えば、ホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. ら, Nature, 10, 105—111, 1984)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば、利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、常法に従って決定することができる(Crantham, R. ら, Nucleic Acids Res., 9, r43—r74, 1981)。更に、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的突然変異誘発法(site specific mutagenesis) (Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662—5666, 1984)等により実施することができる。

これまで述べた種々の方法により得られるDNAの配列決定は、例えば、マキサ

ムーギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. 及び Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. 及び Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982) 等により行なうことができる。

本発明のスクリーニングツール用ポリペプチドは、下記の方法によって得ることができる。単離されたスクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適当なベクターDNA に再び組込むことにより、宿主細胞（好ましくは真核生物、特に好ましくは CHO 細胞又は 293-EBNA 細胞）を形質転換させることができる。

前記形質転換細胞を培養することにより、前記細胞の細胞表面に生産されるスクリーニングツール用ポリペプチドは、前記ポリペプチドの物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離精製することができる。該方法としては、具体的には例えば受容体蛋白質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば本発明のプロキネティシン受容体を表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤 (CHAPS、Triton X-100、ジキトニン等) でプロキネティシン受容体を可溶化することにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

本発明のスクリーニングツール用ポリペプチドはマーカ配列とインフレーションで融合して発現させることで、スクリーニングツール用ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。マーカ配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitopeなどがある。また、マーカ配列とプロキネティシン受容体の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配列を挿入する

ことにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体とHexa-Histidine tagとをトロンビン認識配列で連結した報告がある(Hayashi, M.K. and Haga, T. (1996) J. Biochem., 120, 1232-1238)

2) 形質転換細胞型神経細胞死抑制剤スクリーニングツール

本発明の形質転換細胞型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールとして用いることのできる形質転換細胞（以下、スクリーニングツール用形質転換細胞と称する）としては、例えば、

(1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞；

(2) 機能的等価改変体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞；及び

(3) 相同ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞を挙げることができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞は、例えば、先に述べた方法により単離されたスクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適当なベクターDNA に再び組込むことにより、宿主細胞（好ましくは真核生物、特に好ましくは CHO 細胞又は 293-EBNA 細胞）を形質転換させることにより取得することができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。

前記発現ベクターは、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、前記ポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。また、本発明の形質転換細胞型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールとして用いることのできるス

クリーニングツール用形質転換細胞は、前記発現ベクターで形質転換され、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、形質転換細胞型神経細胞死抑制剤スクリーニングツールとして用いる際に前記ポリペプチドを発現している限り、特に限定されるものではなく、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞であることもできるし、あるいは、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。スクリーニングツール用形質転換細胞は、例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターにより、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞 (Gluzman, Y. (1981)

Cell, 23, 175-182) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞および同細胞に Epstein Barr VirusのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社製) 等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol., 1, 854-864)、ヒトのelongation factorプロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、cytomegalovirusプロモーターを有するpCEP4 (Invitrogen社製) 等を例示できるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) Med.

Immunol., 20, 27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature, 329, 840-842) 等が挙げられる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology, 52, 456-457)、FuGENE6 (Boeringer Mannheim社製) を用いた方法、および電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al. (1982) EMBO J., 1, 841-845) 等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) やpSV2-neo (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341) 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することによりスクリーニング用ポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virusの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4 (Invitrogen社) などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内又は細胞表面に本発明のスクリーニング用ポリペプチドが生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に必要に応じ牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記293-EBNA細胞であれば牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地にG418を加えたものを使用できる。

[2] 神経細胞死抑制剤及び／又は痛覚過敏治療剤スクリーニング方法

スクリーニングツール用ポリペプチド又はスクリーニングツール用形質転換

細胞を用いると、スクリーニングツール用ポリペプチドの活性を修飾可能な物質（化合物、ペプチド及び抗体）を検出及びスクリーニングすることができる。

本発明の検出方法において、スクリーニング用ポリペプチドの活性の変化は、スクリーニングに用いる受容体蛋白質の生理学的な特性に応じた活性の指標を測定することにより行われる。指標とする活性とは、たとえばリガンドとの結合活性であり、あるいはリガンドの結合によってもたらされる刺激に対する応答である。具体的には、以下に述べるような検出方法を示すことができる。スクリーニング用ポリペプチドとしては、該ポリペプチドを発現させた細胞、該細胞の膜分画、又は該ポリペプチドからなる蛋白質の精製標品などを用いることもできる。また本発明によるスクリーニング方法のための被験化合物としては、市販の化合物、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Terrett, N. K., et al. (1995) Tetrahedron, 51, 8135-8137)によって得られた化合物群やファージ・ディスプレイ法(Felici, F., et al. (1991) J. Mol. Biol., 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング方法により選択された化合物又はペプチドを化学的又は生物学的に修飾した化合物又はペプチドを用いるが、それらに限らない。

a) リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明のスクリーニング用ポリペプチドに結合する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）はリガンド結合アッセイ法によりスクリーニングする事ができる。該スクリーニング用ポリペプチドを発現させた細胞膜、あるいは該スクリーニング用ポリペプチドからなる蛋白質精製標品を調製する。緩衝液、イオン、pH のようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で同スクリーニング用ポリペプチドを発現させた細胞膜、あるいは該スクリーニング用ポリペプチドからなる蛋白質精製標品を、標識リガンド、例えば 125 I 標識プロキネティシン（好ましくは 125 I 標識プロキネティシン 2）を被験薬と共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性をγカウンター等で測定する。得られた放射活性リ

ガンドの結合阻害を指標に該スクリーニング用ポリペプチドのアゴニスト活性を有する物質(化合物、ペプチド、及び抗体)、あるいはアンタゴニスト活性を有する物質(化合物、ペプチド、及び抗体)をスクリーニングすることができる。本発明のスクリーニング方法によって選択される、該スクリーニング用ポリペプチドのアンタゴニスト活性を有する物質は、例えば、痛覚過敏症の治療や予防に有用である。また、本発明のスクリーニング方法によって選択される、該スクリーニング用ポリペプチドのアゴニスト活性を有する物質は、神経細胞死抑制、例えば、痴呆症や脳卒中の治療や予防に有用である。

本発明のスクリーニング方法は、WO 01/19986 に記載のリガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法により実施できる。ただし、リガンドは LTC₄ をプロキネティシンに、受容体は LTC₄ 受容体をプロキネティシン受容体(すなわちスクリーニング用ポリペプチド)に置き換える。より具体的には実施例 7 に記載の方法により実施できる。

b) GTP γ S 結合法を利用したスクリーニング方法

本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を修飾する物質(化合物、ペプチド、及び抗体)は GTP γ S 結合法によりスクリーニングすることが可能である(Lazareno, S. and Birdsall, N. J. M. (1993) Br. J. Pharmacol. 109, 1120-1127)。スクリーニング用ポリペプチドを発現させた細胞膜を 20mM HEPES (pH7.4), 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 50mM GDP 溶液中で、³⁵S で標識された GTP γ S 400pM と混合する。被験薬存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合した GTP γ S の放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被験薬存在下における特異的な GTP γ S 結合の上昇を指標に、該スクリーニング用ポリペプチドのアゴニスト活性を有する物質(化合物、ペプチド、及び抗体)をスクリーニングすることができる。また、被験薬存在下における、プロキネティシン(好ましくはプロキネティシン 2)による GTP γ S 結合上昇の抑制を指標に該スクリーニング用ポリペプチドのアンタゴニスト活性を有する物質(化合物、ペプチド、及び抗体)をスクリーニングすることができる。

c) 細胞内 Ca²⁺濃度の変動を利用したスクリーニング方法

本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を修飾する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）は、スクリーニング用ポリペプチドを発現させた細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動を利用してスクリーニングすることが可能である。細胞内の Ca^{2+} 濃度の測定は fura2 や fluo3 等を用いて測定することができる。

あるいは、 Ca^{2+} 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより、間接的に Ca^{2+} 濃度を測定することが可能である。具体的には以下の方法で、 Ca^{2+} 濃度を測定することができる。まず、セラムレスポンシブエレメントをつないだレポーター遺伝子をスクリーニング用ポリペプチドを発現させた細胞に導入し、被験薬を該細胞の培養液中に加える。レポーター遺伝子には、検出可能なシグナルを生成することができる任意の遺伝子を用いることができる。例えばルシフェラーゼ遺伝子は、レポーター遺伝子として望ましい。37°Cで4時間インキュベート後、培地を除去し、細胞を溶解してルシフェラーゼ活性を測定する。そして被験薬添加時のルシフェラーゼ活性誘導を指標にスクリーニング用ポリペプチドのアゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。また、被験薬を該細胞の培養液中に添加後、最終濃度 5-500nM のプロキネティシン（好ましくはプロキネティシン 2）を添加し同様にルシフェラーゼ活性を測定する。そして、被験薬添加時のプロキネティシン（好ましくはプロキネティシン 2）によるルシフェラーゼ活性誘導の阻害を指標に、スクリーニング用ポリペプチドのアンタゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング方法においては、該蛋白質を発現させた細胞と発現させていない宿主細胞（コントロール細胞）に物質（化合物、ペプチド、及び抗体）等を一定時間作用させ、 Ca^{2+} 濃度を直接あるいは間接的に測定する。コントロール細胞と比較して、該蛋白質を発現させた細胞特異的な Ca^{2+} 濃度の上昇又は低下を指標にアゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。また、被験薬存在下における、プロキネティシン（好ましくはプロキネティシン 2）による Ca^{2+} 濃度の上昇又は低下の阻害作用を指標に該スクリーニング用ポリペプチドのアンタゴニスト活性を有する物質（化合物、ペプチド、及び抗体）をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング方法は、実施例 4 記載の条件で行うことが好ましい。

たとえば実施例 4 に記載の条件で、 $EC_{50}=100\mu M$ 以下の物質を、好ましくは $EC_{50}=10\mu M$ 以下の物質を、更に好ましくは $EC_{50}=1\mu M$ 以下の物質をアゴニスト活性を有する物質として、選択することができる。また、実施例 4 に記載のアッセイ条件に被験薬を追加することにより、即ち、実施例 4 の条件で IC_{50} が $10\mu M$ 以下の物質を、好ましくは IC_{50} が $1\mu M$ 以下の物質を、更に好ましくは IC_{50} が $0.1\mu M$ 以下の物質をアンタゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

[3] 神経細胞死抑制用及び／又は痛覚過敏治療用医薬組成物の製造方法

本発明には、本発明のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、神経細胞死抑制用、及び／又は痛覚過敏治療用医薬組成物の製造方法が包含される。

本発明のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注、筋注、若しくは関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあっては、静注等の非経口投与が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水溶性若しくは非水溶性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、有効成分、すなわち、LTRPC2蛋白質の活性化を阻害する物質、あるいは、本発明のスクリーニング方法により得られる物質の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1～100mg、好ましくは0.1～50mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01～50mg、好ましくは0.01～10mgである。

実施例

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982) : "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY 等) に従って実施可能である。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

(実施例 1) 動物細胞でのプロキネティシン発現系の構築

ヒトプロキネティシン 1、2 をコードする遺伝子の増幅には、プロキネティシン 1 はヒト小腸、プロキネティシン 2 はヒト精巣由来の cDNA (Marathon Ready cDNA ; クロンテック社) を鋳型 cDNA に用いた。プロキネティシン 1 が、フォワードプライマーとして、配列番号 3 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして、配列番号 4 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。プロキネティシン 2 がフォワードプライマーとして、配列番号 5 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして、配列番号 6 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。配列番号 4、配列番号 6 で表される塩基配列には FLAG 配列が含まれる。従って、プロキネティシンは、C 末端側にマーカー配列 FLAG エピトープをインフレームで融合して発現される。これにより、プロキネティシンの精製が簡便化できる。なお、前記の各プライマーの 5' 末端には、それぞれ、XbaI 認識配列、NotI 認識配列が付加してある。PCR は DNA ポリメラーゼ (Pyrobest DNA polymerase ; 宝酒造社) を用い、94° C (2 分) の後、96° C (5 秒) / 72° C (1.5 分) のサイクルを 5 回、96° C (5 秒) / 70° C (1.5 分) のサイクルを 5 回、96° C (5 秒) / 68° C (1.5 分) のサイクルを 20 回繰り返した。その結果、プロキネティシン 1、2 共に約 0.3kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (インビトロジェン社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI3700 DNA Sequencer (アプライドバイオシステムズ社) で解析し、既知プロキネティシン 1、2 配列 (GenBank No. AF333024、AF333025) と合致したクローンをそれぞれ選択した。これらクローンを XbaI-NotI で消化し、動物細胞発現用 pCEP4 plasmid (インビトロジェン社) に挿入した。

構築されたプロキネティシン発現プラスミドは、6 ウェルプレート (Collagen-Typel-Coated 6 well plate ; アサヒテクノグラス社製) に HEK293 細胞を 1 ウェルあたり 1×10^5 細胞で播種して 24 時間培養後、1 ウェルあたり $1 \mu\text{g}$ のプロキネティシン 1 又はプロキネティシン 2 発現プラスミドをトランスフェクション試薬 (FuGENE6; ベーリンガーマンハイム社) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 72 時間後より、ハイグロマイシン B 含有培地で遺伝子導入細胞の選択を行い、得ら

れた薬剤耐性細胞をプロキネティシン発現細胞として用いた。プロキネティシン発現細胞は、10cm シャーレ(Collagen-TypeI-Coated ; アサヒテクノグラス社)にコンフルエントになるまで培養後、培地を廃棄し、0.5%牛胎児血清入り DMEM 培地にて4日間培養して、プロキネティシン含有培地を回収した。

(実施例 2) G 蛋白質共役型受容体、GPRg2 の遺伝子クローニングと GPRg2 発現 CHO 細胞の取得

ヒト GPRg2 をコードする遺伝子の増幅には、ヒト脾臓由来の cDNA (Marathon Ready cDNA ; クロンテック社)を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして配列番号 7 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバープライマーとして、配列番号 8 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。なお、前記の各プライマーの 5' 末端には、それぞれ、XbaI 認識配列が付加してある。PCR は DNA ポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、94° C(2 分)の後、96° C(5 秒)/72° C(1.5 分)のサイクルを 5 回、96° C(5 秒)/70° C(1.5 分)のサイクルを 5 回、96° C(5 秒)/68° C(1.5 分)のサイクルを 20 回繰り返した。その結果、約 1.2kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pEF-BOS-dhfr plasmid(Biochim Biophys Acta. 1997 1354:159-70)に挿入した。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI3700 DNA Sequencer(アプライドバイオシステムズ社)を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号 1 に示す。

同配列は 1155 塩基のオープンリーディングフレーム(配列番号 : 1)を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列(384 アミノ酸)を配列番号 2 に示す。

構築された GPRg2 発現プラスミドは、6 ウェルプレートに CHO/dhfr⁻細胞を 1 ウェルあたり 1×10^5 細胞で播種して 24 時間培養後、1 ウェルあたり 1 μ g の GPRg2 発現プラスミドをトランスフェクション試薬(FuGENE6; ベーリンガーマンハイム社)を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 72 時間後より、メトトレキセート含有培地で遺伝子導入細胞の選択を行い、得られた薬剤耐性細胞を GPRg2 発現細胞として用いた。

(実施例 3) ヒト組織における GPRg2 の発現分布解析

GPRg2 の組織発現分布を解析するために、ヒト各組織由来 cDNA を鋳型とし、Taq ポリメラーゼ (Ex Taq ; 宝酒造社) を用いて PCR を行った。PCR 条件は、実施例 1 と同じである。その結果、約 1.2kbp の DNA 断片が扁桃核、海馬、脳梁、黒質、視床、前頭葉、胎児脳に由来する cDNA で増幅された。胃、小腸、精巣由来の cDNA では増幅が確認されなかった。

(実施例 4) GPRg2 発現 CHO 細胞のプロキネティシンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化

96 ウェルプレート (96well Black/clear bottom plate ; BECTON DICKINSON 社) に GPRg2 発現 CHO 細胞もしくは、pEF-BOS-dhfr を組み込んだ CHO 細胞 (空ベクター処理細胞) を 1×10^4 細胞でプレーティングして 24 時間培養後、培地を廃棄し、 $4 \mu\text{M}$ Fluo-3, AM (Molecular Probe 社)、0.004% pluronic acid および 1% FBS と 20mM HEPES を含む Hunk's Balanced Salt Solution (Hanks BSS ; ギブコ社) を 1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ 添加し、 37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を 20mM HEPES を含む Hanks BSS で 4 回洗浄して、1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ の 20mM HEPES を含む Hanks BSS を添加した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は FLIPR (モレキュラーデバイス社) を用いて経時的に測定した。すなわち、測定開始 10 秒後に、プロキネティシンを含む HEK293 細胞培養上清を添加し、添加後、50 秒間は 1 秒毎に、さらに 4 分間は 6 秒毎に蛍光強度を測定した。得られた結果の蛍光値を Y 軸に、時間を X 軸にプロットすると、GPRg2 はプロキネティシンに反応して細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化が観察されたが、プロキネティシンを発現させない HEK293 細胞培養上清では観察されなかった。さらに、同反応は、空ベクターを処理した CHO 細胞では見られなかった。以上のことから、GPRg2 はプロキネティシン 1、2 に対する生体内受容体である事が確認できた。

本プロキネティシン受容体で形質転換した細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定する事でプロキネティシンアゴニスト、アンタゴニスト、すなわち神経細胞死抑制剤、及び／又は痛覚過敏治療剤のスクリーニングが可能となった。

(実施例 5) 動物細胞発現プロキネティシン 1 及び 2 の発現並びに精製

動物細胞で発現させたプロキネティシンの精製サンプルを用いて、放射性同位元素標識を行い、バインディングアッセイ等に用いることを考え、まず、以下の実験により精製プロキネティシンを得た。その際、プロキネティシン 1 は、精製時に用いた FLAG 配列を除去するために、インフレームで FactorXa 配列を入れて、native form と同じものを作製した。また、プロキネティシン 2 は、分子内に放射性同位元素標識に用いる Tyr 残基を有していないため、C 末端の FLAG 配列を残して、同配列中の Tyr 残基に対して放射性同位元素標識することを考えた。具体的には以下の手順で精製プロキネティシンを取得した。

動物細胞で発現させたプロキネティシン 1 を取得するために、フォワードプライマーとして配列番号 9 で表されるオリゴヌクレオチドを、リバープライマーとして、配列番号 10 で表されるオリゴヌクレオチドを使用した。前記の各プライマーの 5' 末端には、それぞれ、SpeI 認識配列が付加してある。なお、配列番号 9 で表される塩基配列には、インフルエンザ A ウイルス・ヘマグルチニンのシグナルシーケンス配列、FLAG 配列、そして Factor Xa 認識配列が含まれる。従って、プロキネティシン 1 は、細胞外分泌後は、N 末端側にマーカー配列 FLAG エピトープと Factor Xa 認識配列をインフレームで融合して発現される。これにより、プロキネティシン 1 の精製が簡便化できる。PCR はパイロベスト DNA ポリメラーゼ (Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社) を用い、94° C(2 分) の後、94° C(30 秒)/55° C(30 秒)/72° C(1.5 分) のサイクルを 20 回繰り返した。その結果、約 1.4kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を SpeI で消化した後、pCEP4 plasmid に挿入した。得られたクローンの塩基配列は、ABI3700 DNA Sequencer を用いて解析した。構築されたプロキネティシン 1 発現プラスミドは、(実施例 1) で用いた方法と同様に、HEK293 細胞に遺伝子導入し、プロキネティシン 1 安定発現細胞株を取得した。

動物細胞で発現させたプロキネティシン 2 の取得のためには、実施例 1 で作製した、C 末端側にマーカー配列 FLAG エピトープをインフレームで融合して発現されるプロキネティシン 2 をコードする cDNA を pEF-BOS-dhfr plasmid に挿入し

て用いた。従って、プロキネティシン 2 は、細胞外分泌後は、C 末端側にマーカ一配列 FLAG エピトープをインフレームで融合して発現される。構築されたプロキネティシン 2 発現プラスミドは、実施例 2 で用いた方法と同様に、CHO/dhfr⁻細胞に遺伝子導入し、プロキネティシン 2 安定発現細胞株を取得した。

実施例 1 と同じ方法で回収したプロキネティシン 1 もしくは、プロキネティシン 2 を含有する培地を、それぞれ M2-アガロースカラム(シグマ社)にかけ、0.5% NaCl 含有 PBS でカラムを洗浄後、プロキネティシン 1 は、Factor Xa (アマシャム社)含有 PBS で一晩反応して、プロキネティシン 2 は、FLAG-peptide 含有 PBS にて、それぞれ M2-アガロースカラムより溶出した。目的プロキネティシンを含む溶出産物は、最終的に Superdex Peptide FPLC カラム(アマシャム社)でゲルろ過を行い精製を行った。精製産物を SDS 電気泳動後、銀染色(第一化学社)を行ったところ、プロキネティシン 2 の方がプロキネティシン 1 よりわずかに高分子側に、共に約 10 kDa の単一バンドとして確認された。プロキネティシン 1 と 2 の推定分子量は、それぞれ 9666.88 Da、10039.31 Da であることから、予測分子量に合致しており、プロキネティシン 1 及び 2 が精製されていることが確認できた。

(実施例 6) GPRg2 発現 HEK293 細胞のプロキネティシンによるルシフェラーゼレポーターアッセイ系の構築

コラーゲンタイプ I をコーティングした 24 ウェルプレート(Collagen-TypeI-Coated 24 well plate;アサヒテクノグラス社)に、HEK293-EBNA 細胞(インビトロジェン社)を 1 ウェル当たり 7×10^4 細胞となるように播種し、24 時間培養した後、実施例 1 で構築した GPRg2 動物細胞発現プラスミド、又はプラスミド pEF-BOS(コントロールとしての空ベクター)(1 ウェル当たり 100ng)と、プラスミド pSRE-luc(ストラタジーン社)(1 ウェル当たり 20ng)とを、遺伝子導入試薬(FuGENE6;ベアリンガーマンハイム社)を用いて、2 者同時に遺伝子導入した。遺伝子導入から 24 時間経過した後、培地を廃棄し、10 nM の精製プロキネティシン 1 もしくは精製プロキネティシン 2 を添加して、5 時間 37°C で反応させ、ルシフェラーゼ・アッセイシステム(和光純薬社)の方法に従い、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、GPRg2 を遺伝子導入した HEK293 細胞では、空ベクターを遺伝子導

入した HEK293 細胞に比べて、細胞内ルシフェラーゼ活性が特異的に上昇していた。

プロキネティシンの代わりに、又はプロキネティシンと同時に被験薬を添加してこの反応系を用いる事で、プロキネティシン 1 又は 2 と同様の活性を有するアゴニスト活性を有する物質（すなわち神経細胞死抑制剤）、並びに GPRg2 に対するプロキネティシン 1 又は 2 の反応を阻害するアンタゴニスト活性を有する物質（すなわち痛覚過敏治療剤）のスクリーニングが可能になった。

(実施例 7) ^{125}I 標識プロキネティシン 2 を用いた GPRg2 受容体結合アッセイ系の構築

150mm 培養シャーレに CHO 細胞及び GPRg2 を安定発現する CHO 細胞をコンフルエントになるまでそれぞれ培養後、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM MgCl_2 にそれぞれ懸濁してホモジナイザー（ポリトロン；キネマティカ社）にてホモジェナイズした。超遠心後、各沈殿物を 50 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM MgCl_2 に懸濁し、これを CHO 膜画分、GPRg2 膜画分とした。 ^{125}I 標識したプロキネティシン 2 (^{125}I -PK2) は、実施例 5 で精製した 5 μg のプロキネティシン 2 を Iodaine-125 (パーキンエルマー社) を用いて、1000-GEN Iodination Tube 法 (ピアス社) に従って作製した。

前記 CHO 膜画分、GPRg2 膜画分各 30 μg に ^{125}I -PK2 を最終濃度 500 pM になるようにそれぞれ加え、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM MgCl_2 、0.1% BSA からなる溶液 50 μl 中で室温 1 時間インキュベーションし、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。グラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで膜画分への総結合量を測定した。さらに、前述の試験に最終濃度 0.5 μM の非標識プロキネティシン 1 もしくは 2（すなわち実施例 5 で精製したプロキネティシン）を加えることで、膜画分への非特異的結合量を測定した。その結果、 ^{125}I -PK2 は GPRg2 を安定発現する CHO 細胞の膜画分に特異的に結合することが分かった。一方、空ベクターを遺伝子導入した CHO 細胞の膜画分では、特異的結合は観察されなかった。

以上のように、本発明の GPRg2 受容体は、プロキネティシン 2 に結合親和性を

持つ受容体であることが確認された。本 GPRg2 受容体を発現する細胞を用いて被験薬存在下で結合実験を行うことで、GPRg2 受容体に対して親和性を有する物質のスクリーニングが可能となった。こうした物質は、プロキネティシン 1 又は 2 の活性を増強する活性を有する物質（すなわち神経細胞死抑制剤）、もしくは GPRg2 に対するプロキネティシン 1 又は 2 の反応を阻害するアンタゴニスト活性を有する物質（すなわち痛覚過敏治療剤）である。

（実施例 8） GPRg2 のヒト脊髄後根神経節での遺伝子発現の確認

脊髄後根神経節は、一次知覚神経の投射を受けており、侵害受容器により感受された痛みの刺激を脳に伝達する役割を担っている神経組織である。そのため、脊髄神経細胞の興奮性を低下させる薬剤は、侵害刺激の伝達を抑制することができる。このような薬剤は、慢性関節リウマチや変形性関節炎における痛みのような病的な痛みを抑える疼痛治療薬として有用である。疼痛には、神経因性疼痛のように侵害刺激を伴わないものも存在するが、神経因性疼痛は、痛みの伝達に関わる神経細胞自体の興奮性が高まっているために誘発される疼痛と考えられているため、神経因性疼痛に対しても脊髄神経細胞の興奮性を低下させる薬剤は有効である（Sotgiu et al., Somatosens. Mot. Res., 9, 227, 1992; Zhang et al., J. Physiol., 84, 798, 2000; Ma and Woolf, Pain, 61, 383, 1995; Sotgiu and Biella, Neurosci. Lett., 283, 153, 2000）。

ヒト GPRg2 遺伝子のヒト脊髄後根神経節での組織発現を解析するために、市販のヒト脊髄後根神経節由来の total RNA（クロンテック社）から、mRNA 精製キット（Oligotex-dT30; 宝酒造社）を用いて mRNA を精製後、逆転写反应用試薬（Super Script; ギブコ社）を用いて逆転写反応を行なうことにより、ヒト脊髄後根神経節 cDNA を調製した。合成された cDNA を鋳型とし、実施例 2 に記載した条件を用いて PCR を行なった。その結果、約 1.2kbp の DNA 断片が増幅され、GPRg2 がヒト脊髄後根神経節で発現している事が確認された。こうした結果より、GPRg2 の活性化機構を調節するような化合物をスクリーニングにより取得することで、疼痛治療薬特には痛覚過敏治療剤を開発できる。

産業上の利用可能性

プロキネティシンの中枢作用として、神経細胞死抑制活性(Eur J Neurosci. 2001 13:1694-702)や痛覚過敏惹起活性(Eur J Pharmacol. 1999 374:189-96)が知られており、従って、前記受容体および／又は前記受容体で形質転換した細胞を用いる本発明のスクリーニング方法によって、中枢作用をコントロールできる有用な物質、例えば、神経細胞死を伴うことが知られている痴呆症、脳卒中、及び／又は痛覚過敏症の治療剤として有用な物質を簡便にスクリーニングすることができる。本発明のスクリーニングツールによれば、神経細胞死抑制剤、及び／又は痛覚過敏治療剤として有用な物質をスクリーニング及び評価することができる。

また、本発明のスクリーニングツール又は本発明のスクリーニング方法により得ることができる、前記受容体の活性を修飾する物質を有効成分とし、担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて製剤化することにより、神経細胞死抑制剤、及び／又は痛覚過敏治療用医薬組成物を製造することができる。

配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号 3～10 の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドあるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列の1~10個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含み、
かつ、
プロキネティシン存在下で細胞内カルシウム濃度が上昇することにより活性が確認できるポリペプチドである、神経細胞死抑制剤スクリーニングツール。
2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、
かつ、
プロキネティシン存在下で細胞内カルシウム濃度が上昇することにより活性が確認できるポリペプチドである、神経細胞死抑制剤スクリーニングツール。
3. 請求の範囲1又は2に記載のポリペプチドであり、神経細胞死抑制剤である痴呆症治療剤、脳卒中治療剤、及び／又は痛覚過敏症治療剤スクリーニングツール。
4. 請求の範囲1又は2に記載のポリペプチドを発現している細胞である、神経細胞死抑制剤スクリーニングツール。
5. 請求の範囲4に記載の細胞であり、神経細胞死抑制剤である痴呆症治療剤、脳卒中治療剤、及び／又は痛覚過敏症治療剤スクリーニングツール。
6. 請求の範囲4又は5に記載の細胞、又は、その細胞膜と、試験化合物とをプロキネティシン存在下で接触させる工程、および前記ポリペプチドの活性変化を分析する工程を含むことを特徴とする、試験化合物がプロキネティシン受容体アンタゴニスト又はアンタゴニストであるか否かを検出する方法。
7. 請求の範囲4又は5に記載の細胞、又は、その細胞膜と、試験化合物とをプロキネティシン存在下で接触させる工程、および前記ポリペプチドの活性変化を分析する工程を含むことを特徴とする、神経細胞死抑制剤をスクリーニングする方法。
8. 請求の範囲 4 又は 5 に記載の細胞、又は、その細胞膜と、試験化合物とをプロキネティシン存在下で接触させる工程、および前記ポリペプチドの活性変化

を分析する工程を含むことを特徴とする、神経細胞死抑制剤である痴呆症治療剤、脳卒中治療剤及び／又は痛覚過敏症治療剤をスクリーニングする方法。

9. 請求の範囲7又は請求の範囲8に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び

前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程

を含むことを特徴とする、神経細胞死抑制剤あるいは痴呆症治療剤、脳卒中治療剤及び／又は痛覚過敏症治療剤医薬組成物の製造方法。

1/1

図 1

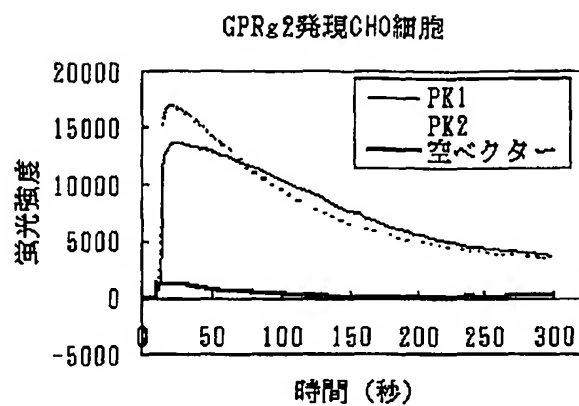
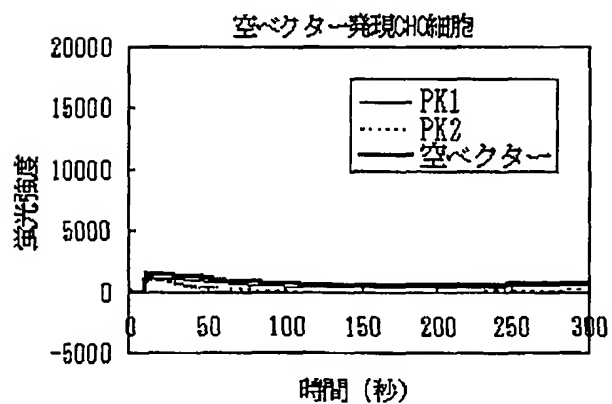


図 2.



1/10

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> NOVEL SCREENING METHODS USING PROKINETICIN RECEPTORS

<130> Y0226-PCT

<150> JP 2001-287448

<151> 2001-09-20

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1155

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1155)

<400> 1

atg gca gcc cag aat gga aac acc agt ttc aca ccc aac ttt aat cca 48

Met Ala Ala Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe Thr Pro Asn Phe Asn Pro

1

5

10

15

ccc caa gac cat gcc tcc tcc ctc tcc ttt aac ttc agt tat ggt gat 96

Pro Gln Asp His Ala Ser Ser Leu Ser Phe Asn Phe Ser Tyr Gly Asp

2/10

20	25	30	
tat gac ctc cct atg gat gag gat gag gac atg acc aag acc cgg acc			144
Tyr Asp Leu Pro Met Asp Glu Asp Glu Asp Met Thr Lys Thr Arg Thr			
35	40	45	
ttc ttc gca gcc aag atc gtc att ggc att gca ctg gca ggc atc atg			192
Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Ile Ala Leu Ala Gly Ile Met			
50	55	60	
ctg gtc tgc ggc atc ggt aac ttt gtc ttt atc gct gcc ctc acc cgc			240
Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Thr Arg			
65	70	75	80
tat aag aag ttg cgc aac ctc acc aat ctg ctc att gcc aac ctg gcc			288
Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala			
85	90	95	
atc tcc gac ttc ctg gtg gcc atc atc tgc tgc ccc ttc gag atg gac			336
Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Ile Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp			
100	105	110	
tac tac gtg gta cgg cag ctc tcc tgg gag cat ggc cac gtg ctc tgt			384
Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys			
115	120	125	
gcc tcc gtc aac tac ctg cgc acc gtc tcc ctc tac gtc tcc acc aat			432
Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn			
130	135	140	
gcc ttg ctg gcc att gcc att gac aga tat ctc gcc atc gtt cac ccc			480

3/10

Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro
 145 150 155 160

ttg aaa cca cgg atg aat tat caa acg gcc tcc ttc ctg atc gcc ttg 528
 Leu Lys Pro Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu
 165 170 175

gtc tgg atg gtg tcc att ctc att gcc atc cca tcg got tac ttt gca 576
 Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Ala
 180 185 190

aca gaa acg gtc ctc ttt att gtc aag agc cag gag aag atc ttc tgt 624
 Thr Glu Thr Val Leu Phe Ile Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys
 195 200 205

ggc cag atc tgg cct gtg gat cag cag ctc tac tac aag tcc tac ttc 672
 Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe
 210 215 220

ctc ttc atc ttt ggt gtc gag ttc gtg ggc cct gtg gtc acc atg acc 720
 Leu Phe Ile Phe Gly Val Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr
 225 230 235 240

ctg tgc tat gcc agg atc tcc cgg gag ctc tgg ttc aag gca gtc cct 768
 Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro
 245 250 255

ggg ttc cag acg gag cag att cgc aag cgg ctg cgc tgc cgc agg aag 816
 Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys
 260 265 270

4/10

acg gtc ctg gtg ctc atg tgc att ctc acg gcc tat gtg ctg tgc tgg 864
Thr Val Leu Val Leu Met Cys Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp
275 280 285

gca ccc ttc tac ggt ttc acc atc gtt cgt gac ttc ttc ccc act gtg 912
Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val
290 295 300

ttc gtg aag gaa aag cac tac ctc act gcc ttc tac gtg gtc gag tgc 960
Phe Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys
305 310 315 320

atc gcc atg agc aac agc atg atc aac acc gtg tgc ttc gtg acg gtc 1008
Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Val Cys Phe Val Thr Val
325 330 335

aag aac aac acc atg aag tac ttc aag aag atg atg ctg ctg cac tgg 1056
Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Met Leu Leu His Trp
340 345 350

cgt ccc tcc cag cgg ggg agc aag tcc agt gct gac ctt gac ctc aga 1104
Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg
355 360 365

acc aac ggg gtg ccc acc aca gaa gag gtg gac tgt atc agg ctg aag 1152
Thr Asn Gly Val Pro Thr Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
370 375 380

tga 1155

385

5/10

<210> 2

<211> 384

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe Thr Pro Asn Phe Asn Pro

1

5

10

15

Pro Gln Asp His Ala Ser Ser Leu Ser Phe Asn Phe Ser Tyr Gly Asp

20

25

30

Tyr Asp Leu Pro Met Asp Glu Asp Glu Asp Met Thr Lys Thr Arg Thr

35

40

45

Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Ile Ala Leu Ala Gly Ile Met

50

55

60

Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Thr Arg

65

70

75

80

Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala

85

90

95

Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Ile Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp

100

105

110

Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys

115

120

125

Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn

130

135

140

Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro

145

150

155

160

Leu Lys Pro Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu

165

170

175

Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Ala

6/10

	180		185		190										
Thr	Glu	Thr	Val	Leu	Phe	Ile	Val	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ile	Phe	Cys
	195						200					205			
Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Val	Asp	Gln	Gln	Leu	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Tyr	Phe
	210					215						220			
Leu	Phe	Ile	Phe	Gly	Val	Glu	Phe	Val	Gly	Pro	Val	Val	Thr	Met	Thr
225					230					235				240	
Leu	Cys	Tyr	Ala	Arg	Ile	Ser	Arg	Glu	Leu	Trp	Phe	Lys	Ala	Val	Pro
			245						250					255	
Gly	Phe	Gln	Thr	Glu	Gln	Ile	Arg	Lys	Arg	Leu	Arg	Cys	Arg	Arg	Lys
	260							265					270		
Thr	Val	Leu	Val	Leu	Met	Cys	Ile	Leu	Thr	Ala	Tyr	Val	Leu	Cys	Trp
	275						280						285		
Ala	Pro	Phe	Tyr	Gly	Phe	Thr	Ile	Val	Arg	Asp	Phe	Phe	Pro	Thr	Val
	290						295						300		
Phe	Val	Lys	Glu	Lys	His	Tyr	Leu	Thr	Ala	Phe	Tyr	Val	Val	Glu	Cys
305					310					315				320	
Ile	Ala	Met	Ser	Asn	Ser	Met	Ile	Asn	Thr	Val	Cys	Phe	Val	Thr	Val
			325						330					335	
Lys	Asn	Asn	Thr	Met	Lys	Tyr	Phe	Lys	Lys	Met	Met	Leu	Leu	His	Trp
	340							345					350		
Arg	Pro	Ser	Gln	Arg	Gly	Ser	Lys	Ser	Ser	Ala	Asp	Leu	Asp	Leu	Arg
	355						360						365		
Thr	Asn	Gly	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Glu	Val	Asp	Cys	Ile	Arg	Leu	Lys
	370					375							380		

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

7/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 3

ctagtctaga atgagaggtg ccacgcgagt ctcaatca

38

<210> 4

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

goggccgcct acttatcgtc gtcaccttg taatcctoga gaaaattgat gttcttcaag 60
tccatggag 69

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

8/10

synthesized primer sequence

<400> 5

ctagtctaga atgaggagcc tgtgctgcgc cccactcc

38

<210> 6

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

gcggccgcct acttatcgtc gtcaccttg taatcctoga gcttttgggc taaacaaata 60
aatcggta 69

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

ctagtctaga atggcagccc agaatggaaa caccagtt

38

9/10

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

ctagtctaga ttacttcagc ctgatacagt ccacctct

38

<210> 9

<211> 236

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

actagtatga agacgatcat cgccctgagc tacatcttct gcctgggtatt cgccgactac 60
aaggacgatg atgacaagtc tagacaccat catcatcatc attcttctgg tctggtgccca 120
cgcggttctg gtatgaaaga aaccgctgct gctaaattcg aacgccagca catggacagc 180
ccagatctgg gtaccggtgg tggctcgggt atcgaaggtc gtgctgtgat cacagg 236

<210> 10

<211> 53

<212> DNA

10/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

actagtggtc ccaggtgggg accctcactc tagattaaaa attgatgttc ttc 53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09351

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P43/00,
A61P25/28, A61P25/00, A61P25/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P43/00,
A61P25/28, A61P25/00, A61P25/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 01/68699 A (Bayer AG), 20 September, 2001 (20.09.01), & AU 200154686 A	1-5 6-9
X A	WO 01/68700 A (Bayer AG), 20 September, 2001 (20.09.01), & AU 200142459 A	1-5 6-9
X A	WO 98/46620 A (Millennium Pharmaceuticals, Inc.), 22 October, 1998 (22.10.98), & AU 9869736 A & US 5891720 A & EP 1007536 A	1-5 6-9
X A	WO 01/53308 A (SmithKline Beecham Corp.), 26 July, 2001 (26.07.01), & US 2002/0004222 A	1-5 6-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 24 October, 2002 (24.10.02)	Date of mailing of the international search report 12 November, 2002 (12.11.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09351

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	M. LI, "Identification of Two Prokineticin cDNAs: Recombinant Proteins Potently Contract Gastrointestinal Smooth Muscle", Molecular Pharmacology, Vol. <u>59</u> , pages 692 to 698, 2001.04 .	1-5 6-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/50 G01N 33/15 A61K 45/00 A61P 43/00 A61P 25/28 A61P 25/00 A61P 25/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/50 G01N 33/15 A61K 45/00 A61P 43/00 A61P 25/28 A61P 25/00 A61P 25/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2002年
日本国登録実用新案公報 1994-2002年
日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 01/68699 A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 2001. 09. 20 & AU 200154686 A	1-5 6-9
X A	WO 01/68700 A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 2001. 09. 20 & AU 200142459 A	1-5 6-9
X A	WO 98/46620 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 1998. 10. 22 & AU 9869736 A & US 5891720 A & EP 1007536 A	1-5 6-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 10. 02

国際調査報告の発送日

12.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JJP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
宮澤 浩



2 J 9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 01/53308 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2001.07.26 & US 2002/0004222 A	1-5 6-9
X A	M.LI, "Identification of Two Prokineticin cDNAs: Recombinant Proteins Potently Contract Gastrointestinal Smooth Muscle", Molecular Pharmacology, vol. <u>59</u> , p.692-698, 2001.04	1-5 6-9